

Aus den Medizinischen Kliniken und Polikliniken
der Justus Liebig-Universität Gießen

Direktoren:

Prof. Dr. H. J. Dengler, Prof. Dr. H. A. Kühn, Prof. Dr. H. G. Lasch

Über den Einfluß der Proteinsynthese in der Leber
auf die Entwicklung des cholestatischen Ikterus
unter Anit (1-Naphthyl-Iso-Thiocyanat)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Martin Grün
aus Freiburg/Breisgau

Gießen 1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus den Medizinischen Kliniken und Polikliniken
der Justus Liebig-Universität Gießen

Direktoren:

Prof. Dr. H. J. Dengler, Prof. Dr. H. A. Kühn, Prof. Dr. H. G. Lasch

Über den Einfluß der Proteinsynthese in der Leber
auf die Entwicklung des cholestatischen Ikterus
unter Anit (1-Naphthyl-Iso-Thiocyanat)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Martin Grün
aus Freiburg/Breisgau

Gießen 1970



Dekan: Prof. Dr.E.Habermann
Referent: Prof.Dr.H.A.Kühn
Correferent: Prof.Dr.H.J.Dengler

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	Seite 1
II.	MATERIAL	Seite 4
III.	METHODEN	Seite 7
IV.	ERGEBNISSE	Seite 15
V.	DISKUSSION	Seite 37
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	Seite 43
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	
VIII.	LEBENS LAUF	

I. EINLEITUNG

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegende Fragestellung einer Beziehung zwischen Proteinsynthese und Ikterus ergab sich aus Beobachtungen an Patienten mit unterschiedlichen Lebererkrankungen und aus Ergebnissen vorausgegangener Tierversuche (32,37,29). In diesen Untersuchungen hatte sich zeigen lassen, daß es bei Patienten mit Lebererkrankungen unterschiedlicher Genese und vor allem bei Patienten mit akuter Hepatitis und Verschlußikterus zu einer erhöhten Proteinsynthese in der Leber kommt. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß bei Ratten Intoxikationen, die eine Cholestase auslösen können, ebenfalls zu einer Steigerung der Proteinsynthese führen. Dabei haben die bisherigen Untersuchungen ergeben, daß nicht nur die Proteinsynthese erhöht ist, sondern daß auch andere Syntheseleistungen (Nukleinsäuren, NAD, Cholesterin) gesteigert ablaufen.

Bislang war der Nachweis einer gesteigerten Proteinsynthese in der Leber als zusätzliches Symptom zu den bisher bekannten Symptomen wie z.B. Ikterus etc. einzuordnen. Dabei mußte die Frage offenbleiben, ob die Steigerung der Proteinsynthese in der Leber als Ausdruck einer Leberzellschädigung aufzufassen ist. Es wurden deshalb im Tierversuch Untersuchungen durchgeführt, die zeigen sollten, ob der gesteigerten

Proteinsynthese in der Rattenleber eine ätiologische Bedeutung für die Entwicklung des Ikterus zukommt.

Besonders gut reproduzierbar und ausgeprägt waren die Veränderungen in der Rattenleber bei der ANIT-Cholestase, die deshalb als Modell für die weiteren Untersuchungen ausgewählt wurde. In der vorliegenden Arbeit sollte als Weiterführung der bisher gefundenen Ergebnisse folgende Fragen untersucht werden:

- 1 a) Läßt sich bei bereits bekannter globaler Steigerung der Nukleinsäuresynthese - sowohl eine erhöhte RNS- als auch DNS-Synthese nachweisen?
- b) Sind die gemessenen Veränderungen leberspezifisch?
- c) Läßt sich bei der Proteinsynthesesteigerung auch ein Anstieg der Synthese des Serum-Albumins und Fibrinogens in vivo nachweisen?
- 2) Läßt sich der klinische Ablauf der ANIT-Cholestase durch Orotsäure- und Nialamid-Vorbehandlung beeinflussen?
- 3) Welchen Einfluß auf den klinisch-chemischen Ablauf der ANIT-Cholestase hat die Steigerung oder Hemmung der Proteinsynthese in der Leber?

ERLÄUTERUNGEN der in der vorliegenden Arbeit verwandten Abkürzungen.

ANIT	: 1-Naphthyl-Iso-Thiocyanat
ATP	: Adenosintriphosphat
DNS	: Desoxyribonukleinsäure
RNS	: Ribonukleinsäure
NAD	: Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
AP	: Alkalische Phosphatase
GPT	: Glutamat-Pyruvat-Transaminase
LAP	: Leucin-Amino-Peptidase
KRB	: Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer
EK	: Endkonzentration
Dpm	: Desintegrations per minute
TCS	: Trichloressigsäure

II. MATERIAL

RADIOAKTIVE SUBSTANZEN:

14-C-L-Asparaginsäure (U)	(spez.Aktivität 8,8 mC/mMol)
14-C-Glycin (U)	(spez.Aktivität 15,2 mC/mMol)
14-C-2-Na-Azetat	(spez.Aktivität 38,0 mC/mMol)
14-C-7-Nikotinsäure	(spez.Aktivität 27,9 mC/mMol)

wurden von der Firma Buchler & Co. Braunschweig bezogen.

THROMBIN: Topostasin 3000 NIH E Deutsche Hoffmann-
La-Roche AG

PROTAMINHYDROCHLORID: Protamin 1000 Roche (1,0 ml
neutralisiert 1000 USPE) Deutsche-
Hoffmann-La-Roche AG

CALCIUM-CHLORID M/40 : Behring-Werke, Marburg-Lahn

CHLORAMPHENICOL: Chloromycetin-Monosuccinat-Na Parke Davis

KCN (puriss.): E. Merck, Darmstadt

STREPTOMYCIN: SERVA Entwicklungslabor Heidelberg

ACTINOMYCIN D(reinst): SERVA Entwicklungslabor Heidelberg

CYCLOHEXIMID (Actidion): SERVA Entwicklungslabor Heidelberg

JODAZETAT: EGA-Chemie KG Steinheim

FLUORESSIGSÄURE-Na-Salz (90%) : EGA-Chemie KG Steinheim

ANIT (1-Naphthyl-Iso-Thiocyanat): EGA-Chemie KG Steinheim

NIALAMID: NIAMID-Substanz Pfizer G.m.b.H. Karlsruhe

HEPARIN VITRUM 5000 IE/ml: Deutsche Kabi G.m.b.H.München

OROTSAUREFUTTER (1%) : Altromin G.m.b.H.Lage

IKTEROGENIN: wurde freundlicherweise von Herrn Dr.

R.P.Enslin, National Chemical Laboratory

Pretoria, Union of South Africa, zur Verfügung gestellt.

Bestimmung der Serumwerte:

Testansätze der Firma C.F.Boehringer & Söhne, Mannheim.

BILIRUBIN: Testansatz Nr. TC-BI- 15944 TBAA

CHOLESTERIN: Testansatz Nr. TC-CH- 15949 TCAA

GPT: Testansatz Nr. TC-H-II 15956 TGAK

LAP: Testansatz Nr. TC-LAP- 15952 TLAF

Bestimmung der AP nach dem kinetischen Test der Firma
E.Merck, Darmstadt.

ALKALISCHE PHOSPHATASE: 3314 Merckotest

PROTEINSTANDARD: (Human crystallized Albumin) DADE Cat.
No B 5158 Code:Prostan, DADE Reagents
Inc.Miami, Florida.

Messung der Radioaktivität:

Die Radioaktivität wurde gemessen im

TRI-CARB-LIQUID-SCINTILLATION-COUNTER Modell Nr.3375
(Firma Packard, Frankfurt-Main)

SCINTILLATOR-SUBSTANZEN: wurden von der Firma Packard,
Frankfurt-Main bezogen.

TIERMATERIAL:

Männliche Albinoratten vom Stamm SPRAGUE-DAWLEY
(200 - 250g) von der Süddeutschen Versuchstier-
farm, Tuttlingen.

Männliche Albinoratten vom Stamm FW 49 (200- 250g)
der Firma Dr.Karl THOMAE, Biberach a.d. Riss.

III. METHODEN

1. Trennung von RNS und DNS (nach SCHMIDT und THANN-HAUSER) (31).

Zur Extraktion der säurelöslichen Anteile werden die inkubierten Leberschnitten nach dem Auftauen in der Kälte (0°C.) in 1,0 ml 5% TCS homogenisiert. Die Abtrennung des Präcipitats erfolgte durch Zentrifugieren, 10 Minuten bei 3000 g. Der Rückstand wird noch 2-mal wie oben angegeben behandelt. Entfetten des Homogenates durch 2-maliges Waschen mit 5,0 ml Äthanol und 3-maliges Extrahieren mit 5,0 ml Äthanol-Äther 3:1 im Wasserbad 5 Minuten bei 50°C. bei verschlossenen Zentrifugengläsern. Nach dem Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes wird jede Probe mit 0,5 mg inaktiver DNS (gelöst in 0,5 ml 0,95% NaCl) versetzt. Zur quantitativen RNS-Hydrolyse wird zu den Proben 1,5 ml 1n KOH gegeben und bei 37°C. über 15 - 20 Stunden in verschlossenen Zentrifugengläsern gehalten. Nach Abkühlung im Eisbad werden die Proben mit 6n HCl unter Verwendung von 0,02 ml alkoholischer Phenolphthalein-Lösung als Indikator neutralisiert. Zur DNS- und Proteinfällung wird 1,0 ml 5% TCS dazugegeben und anschließend 30 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Ein Aliquot des RNS-Hydrolysates (Überstand) wird mit 10,0 ml THIX-GEL-Scintillator zur

Radioaktivitätsmessung verwandt. Der Rückstand nach RNS-Hydrolyse wird 2-mal in 5,0 ml 5% TCS gewaschen und anschließend die DNS-Nukleotide in 1,0 ml 5% TCS im Wasserbad 15 Minuten lang bei 90°C. extrahiert. Danach wird 30 Minuten bei 3000 g zentrifugiert und vom Überstand ein Aliquot mit 10,0 ml THIX-GEL-Scintillator zum Zählen eingesetzt. Der Rückstand nach DNS-Hitzeextraktion wird mit je 5,0 ml Äthanol und Äther gewaschen und anschließend in 0,5 ml 98% Ameisensäure gelöst. Ein Aliquot des Lysates wird zum Zählen der Aktivitäten und 0,01 ml zur Proteinbestimmung nach LOWRY (16) verwandt.

2. Albuminisolierung (nach MAJUMDAR) (17)

9,8 ml 1% TCS in 95% Äthanol werden 0,2 ml Serum zugesetzt und 20 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 30 Minuten zentrifugieren bei 3000 g wird dem Überstand 1,0 ml Wolframatophosphorsäure (5% Lsg. in 2 M HCl) zugefügt. Zur Ausfällung bleiben die Proben 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen und werden anschließend 30 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Das Präcipitat wird je in 5,0 ml Äthanol und Äther gewaschen. Das trockene Albumin wird in 0,5 ml 2n NaOH gelöst. Ein Aliquot der Albuminlösung wird zum Zählen der radioaktiven Impulse und 0,01 ml zur Proteinbestimmung nach LOWRY eingesetzt.

3. Fibrinisolierung (17)

Zu 0,5 ml Serum werden 0,1 ml Protaminhydrochlorid, 8,5 ml 0,95% NaCl, 0,5 ml CaCl_2 (M/40) und 0,5 ml (100 NIH E) Thrombin pipettiert. Die Mischung wird eine Stunde im Wasserbad bei 37°C . inkubiert. Das gebildete Fibrin wird 30 Minuten bei 3000 g zentrifugiert, einmal mit 5,0 ml 0,95% NaCl und je einmal mit 5,0 ml Äthanol und Äther gewaschen. Das trockene Fibrin wird mit 0,5 ml 2n NaOH versetzt und 30 Minuten im kochenden Wasserbad bei verschlossenen Zentrifugengläsern hydrolysiert. Ein Aliquot wird zur Zählung der Radioaktivität und 0,01 ml zur Proteinbestimmung nach LOWRY benutzt.

4. Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (16)

5. Herstellen der Leberschnitten nach WINTER und SCHNEIDER (32,37)

6. Inkubationsansatz (siehe Seite 10)

7. Radioaktivitätsmessung (siehe unter 5.)

8. Die weitere Aufarbeitung der Proben nach der Inkubation wurde nach dem Schema auf S. 10 durchgeführt.

9. Signifikanzberechnung

Die Signifikanzen wurden nach dem t-Test nach STUDENT berechnet.

Die Berechnung nach einem Test, der keine Normalverteilung der Stichproben voraussetzt (WILCOXON), ergab praktisch gleiche Ergebnisse.

ANFANGSSTADIUM

Tabella 1. Mit der Zeit und zusammengefasst den Auf-
arbeitungsprozess wieder.

1. Anfertigen der Tiere. Herzpunktion und Heraus-
nahme der Leber.

2. Herstellen der Leberschnitten.

3. Wiegen des feuchten Lebergewebes.

4. Inkubation mit:

1,3 μ C 14-C-L-Asparagins.(U) (EK.5,75 x 10⁻⁴ M)

1,3 μ C 14-C-2-Na-Azetat (EK.1,0 x 10⁻³ M)

1,3 μ C 14-C-Glycin (U) (EK.5,4 x 10⁻⁴ M)

0,57 μ C 14-C-7-Nikotins. (EK.45,0 x 10⁻⁵ M)

Glukose (EK.5,0 x 10⁻³ M)

in 2,0 ml KHE pH 7,4; Temp. 37°C.; t= 60 Min.

Vakuumatmosphäre.

5. Einfrieren und Auftauen.

6. Nukleotidextraktion mit 5% TCS bei 0° Celsius.

7. Mitrextraktion mit Ethanol 1. Ethanol-Wasser 3:1

8. Mitrextraktion mit 10 KHE 15-20 Stunden bei 37°C.

DMS-Fällung mit 5% TCS.

9. DMS-Extraktion in 5% TCS, 15 Min. bei 90°C.

10. Waschen und Trocknen des Proteinrestes.

11. Bestimmung der Geruchswerte.

TIERVERSUCHE

1.0 Methodische Versuche

Proteinsynthese in Rattenleberschnitten in vitro
unter verschiedenen Bedingungen

1.1 mit O₂ und N₂

Feucht eingewogene Leberschnitten wurden nach 1/2-stündiger Vorinkubation 60 Minuten in 3,0 ml KRB, pH 7,4 unter Zusatz von 0,1 ml 5% Glukose und je 0,1 ml 14-C-Glycin, 14-C-L-Asparaginsäure, 14-C-7-Nikotinsäure und 14-C-2-Na-Azetat inkubiert. Die eine Hälfte der Proben wurde mit 95% O₂/5% CO₂ und die andere Hälfte mit 95% N₂/5% CO₂ begast.

1.2 mit KCN, Jodazetat, Fluorazetat, Streptomycin, Chloramphenicol und Actinomycin D.

Dem Inkubationsansatz wie unter 1.1 wurde in je zwei Ansätzen KCN, Jodazetat, Fluorazetat, Streptomycin, Chloramphenicol und Actinomycin D in einer Endkonzentration von 10⁻³ M zugesetzt.

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte nach dem auf Seite 10 dargestellten Schema.

2.0 Protein-, DNS-, RNS- und Cholesterinsynthese in Rattenleberschnitten in vitro nach Ikterogenin- und ANIT-Applikation.

2.1 200 - 250g schwere männliche Albinoratten erhielten eine einmalige Dosis von 100 mg/kg

Ikterogenin i.p. (30 mg Ikterogenin wurden in 0,4 ml Äthanol gelöst und mit aqua dest. ad 5,0 ml aufgefüllt; 3,5 ml wurden je Tier injiziert).

Die Tiere wurden 24 Stunden und 48 Stunden nach Ikterogenin-Applikation getötet und die Synthesen in der angegebenen Weise gemessen.

2.2 Versuchstieren (200 - 250g) wurde per Schlundsonde eine einmalige Dosis von 100 mg/kg ANIT, gelöst in je 1,0 ml reinem Olivenöl, verabreicht; die Kontrolltiere erhielten nur das Lösungsmittel. 48 und 72 Stunden nach ANIT-Gabe wurden die Versuchstiere getötet und die oben angegebenen Synthesen, wie beschrieben, gemessen.

3.0 Proteinsynthese in Darm, Milz, Haut und Aorta
48 Stunden nach ANIT-Applikation.

Im Vergleich zu einer Kontrollgruppe wurde die Proteinsynthese in Darm, Milz, Haut und Aorta von Ratten 48 Stunden nach einmaliger, oraler ANIT-Gabe gemessen.

4.0 Fibrinogen- und Albuminsynthese in vivo.

4.1 Kontroll- und Versuchstieren, denen 72 Stunden vorher 100 mg/kg ANIT oral appliziert worden war, wurden je 2,5 μ C 14 -C-Glycin und 2,5 μ C 14 -C-L-Asparaginsäure intraperitoneal gespritzt. 60 Minuten nach Injektion der radioaktiven Substanzen wurden die Tiere getötet. Die

Isolierung des Fibrinogens und Albumins erfolgte in der angegebenen Weise.

- 4.2 Den 200 - 250 g schweren Versuchstieren wurde drei Tage je 0,8 mg/kg Cycloheximid intraperitoneal verabreicht. Dann wurde dieser Gruppe und einem unbehandelten Kontrollkollektiv i. p. $5\text{ }\mu\text{C}$ $^{14}\text{-C}$ -Leucin injiziert. 60 Minuten später wurden die Tiere getötet und das Albumin und Fibrinogen wie angegeben isoliert.
- 5.0 Beeinflussung der ANIT-Cholestase der Ratte durch Orotsäure oder Nialamid.
- 5.1 Die Versuchstiere erhielten 11 Tage lang 1% Orotsäurefutter. Anschließend wurde diesen Tieren sowie einer unbehandelten Kontrollgruppe 100 mg/kg ANIT per Schlundsonde verabreicht. 72 Stunden nach der ANIT-Applikation wurden die Tiere getötet und Bilirubin, GPT, AP, LAP und Cholesterin im Serum bestimmt.
- 5.2 Eine Gruppe Versuchstiere erhielt 7 Tage Nialamid im Trinkwasser ad libitum (120mg/100 ml 0,16n HCL). Am 5. Tag bekamen die Tiere per os 100 mg/kg ANIT. 72 Stunden nach der ANIT-Applikation wurden die Tiere getötet und Bilirubin, GPT, AP, LAP und Cholesterin im Serum bestimmt.
- 6.0 Einfluß von Luminalvorbehandlung auf die ANIT-Cholestase.

6.1 Den Versuchstieren wurde 5 Tage 50 mg/kg Luminal intraperitoneal injiziert. Anschließend erhielten die Tiere oral 100 mg/kg ANIT. 24, 48, 72 Stunden später wurden die Tiere und jeweils ein Kollektiv Ratten getötet, das nur ANIT erhalten hatte.

Bei jeweils getrennten Tierkollektiven wurden die Proteinsynthese in der Leber und die Serumwerte gemessen.

7.0 Einfluß von zusätzlicher Cycloheximidbehandlung auf die ANIT-Cholestase.

7.1 Einem Versuchstierkollektiv wurde 3 Tage 0,8 mg/kg Cycloheximid intraperitoneal injiziert. Am 2. Tag bekamen diese Tiere und unbehandelte Ratten eine einmalige Dosis von 100 mg/kg ANIT. 72 Stunden nach der ANIT-Applikation wurden die Versuchstiere getötet und Bilirubin, GPT, AP, LAP und Cholesterin im Serum bestimmt.

Bei einem weiteren Tierkollektiv wurde unter den gleichen Versuchsbedingungen die Proteinsynthese in der Leber gemessen.

IV. ERGEBNISSE

1. Methodische Untersuchungen

Es wurde wie bei den bisherigen Untersuchungen(32, 37) die Proteinsynthese in Rattenleberschnitten in vitro gemessen.

Versuchsbedingungen	n	Protein-Synthese % der Kontrolle	NAD-Synthese % der Kontrolle	Nukleinsäure-Synthese % der Kontrolle
mit KCN	4	6	3	16
mit Jodacetat	2	6	3	34
mit Stickstoff	3	3	5	56
mit Actinomycin D	2	13	9	62
mit Fluoracetat	2	42	43	86
mit Streptomycin	4	50	56	134
mit Chloramphenicol	4	100	100	100

Tab.2 Protein-, NAD- und Nukleinsäure-Synthese in der Rattenleber in vitro unter verschiedenen Inkubationsbedingungen. Die hemmenden Substanzen wurden in einer EK. von 10^{-3} M zugesetzt. Bei drei Versuchen wurde der Inkubationsansatz mit 95% N_2 /5% CO_2 begast. Die Kontrollen wurden mit 95% O_2 /5% CO_2 begast.

Der Versuch zeigt, daß die Inkorporation von ^{14}C -Aminosäuren in das Leberprotein, die NAD- und

Nukleinsäure-Fraktion hemmbar ist, was dafür spricht, daß keine unspezifische Adsorption an die Zellbestandteile vorliegt.

Die Substanzen KCN und Jodazetat in einer EK. von 10^{-3} M sowie Begasen mit 95% N₂/5% CO₂ hemmen die in der Tabelle aufgeführten Synthesen nahezu vollständig. Fluorazetat und Streptomycin bewirken in der gleichen Konzentration noch eine deutliche Hemmung (21). Unter Chloramphenicol konnte - wie zu erwarten - gegenüber den Kontrollen keine Verminderung der Synthesen gemessen werden (36).

2. Untersuchungen zur RNS- und DNS-Synthese unter Ikterogenin und ANIT ⁺

In zwei früheren Arbeiten (32,37) konnte gezeigt werden, daß nach Ikterogenin und ANIT in der Rattenleber Veränderungen ausgelöst werden können, die eine Steigerung der Protein-, Nukleinsäure- und Cholesterin-Synthese bewirken. Dabei wurde früher nur die Gesamtnukleinsäuresynthese gemessen. Um zu prüfen, ob sowohl die RNS- als auch die DNS-Synthese von diesen Veränderungen betroffen werden, wurden Ratten-

⁺Ikterogenin: Triterpen aus der LIPPIA RHEMANNII (1, 38)

ANIT: 1-Naphthyl-Iso-Thiocyanat

leberschnitten von entsprechend vorbehandelten Tieren nach Angaben von SCHMIDT und THANNHAUSER (31) aufgearbeitet.

Untersuchungs- bedingungen	n	Proteinsynthese	DNS-Synthese	RNS-Synthese	Cholesterinsynthese
		dpm / mg Protein $\times 10^{-4}$			
Kontrolle	8	$0,42 \pm 0,1$	$0,17 \pm 0,02$	$1,8 \pm 0,32$	$0,53 \pm 0,09$
Ikterogenin 24 Std.	7	$0,92 \pm 0,34$	$0,33 \pm 0,15$	$3,59 \pm 1,3$	$0,84 \pm 0,35$
p		$< 0,0025$	$< 0,01$	$< 0,0025$	$< 0,025$

Tab.3 Protein-, DNS-, RNS- und Cholesterin-Synthese in Rattenleberschnitten in vitro 24 Stunden nach intraperitonealer Injektion von 100 mg/kg Ikterogenin gegenüber einer Kontrollgruppe.

Untersuchungs- bewingungen	n	Proteinsynthese	DNS-Synthese	RNS-Synthese	Cholesterinsynthese
		dpm / mg Protein x 10 ⁻⁴			
Kontrolle	8	0.42 ± 0.1	0.17 ± 0.02	1.8 ± 0.32	0.53 ± 0.09
Ikterogenin 48 Std.	6	1.87 ± 0.85	0.64 ± 0.24	10.5 ± 3.1	2.39 ± 0.93
p		< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005	< 0.0005

Tab.4 Protein-, DNS-, RNS- und Cholesterin-Synthese in Rattenleberschnitten in vitro 48 Stunden nach intraperitonealer Injektion von 100 mg/kg Ikterogenin im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv.

Wie aus Tabelle 3 und 4 ersichtlich ist, findet sich 24 und 48 Stunden nach intraperitonealer Applikation von 100 mg/kg Körpergewicht Ikterogenin eine deutliche Protein- und Cholesterin-Synthesesteigerung und bestätigt damit frühere Ergebnisse (32,37). Zusätzlich läßt sich zeigen, daß sowohl die RNS- als

auch die DNS-Synthese deutlich und signifikant erhöht sind. Prinzipiell gleiche Veränderungen lassen sich auch 48 und 72 Stunden nach oraler Gabe von 100 mg/kg ANIT nachweisen (Tabelle 5 und 6), wobei sich auch in diesen Untersuchungen die Ergebnisse von WINTER und SCHNEIDER eindeutig bestätigen ließen.

Untersuchungs- bedingungen	n	Proteinsynthese	DNS-Synthese	RNS-Synthese	Cholesterinsynthese
		dpm / mg Protein x 10 ⁻⁴			
Kontrolle	8	0,42 ± 0,1	0,17 ± 0,02	1,8 ± 0,32	0,53 ± 0,09
ANIT 48 Std.	6	2,75 ± 0,8	0,97 ± 0,37	9,0 ± 3,7	2,71 ± 0,65
p	-	< 0,0005	< 0,0005	< 0,0005	< 0,0005

Tab.5 Protein-, DNS-, RNS- und Cholesterin-Synthese in Rattenleberschnitten in vitro 48 Stunden nach einmaliger oraler Gabe von 100 mg/kg ANIT verglichen mit einem Kontrollkollektiv.

Untersuchungs- bedingungen	n	Proteinsynthese	DNS-Synthese	RNS-Synthese	Cholesterinsynthese
		dpm / mg Protein $\times 10^{-4}$			
Kontrolle	8	$0,42 \pm 0,1$	$0,17 \pm 0,02$	$1,8 \pm 0,32$	$0,53 \pm 0,09$
ANIT 72 Std.	8	$2,22 \pm 0,54$	$0,61 \pm 0,18$	$16,6 \pm 4,5$	$5,16 \pm 0,68$
p	-	< 0,0005	< 0,0005	< 0,0005	< 0,0005

Tab.6 Protein-, DNS-, RNS- und Cholesterin-Synthese in Rattenleberschnitten in vitro 72 Stunden nach einmaliger oraler Gabe von 100 mg/kg ANIT im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv.

Tabelle 7 zeigt die klinisch-chemischen Veränderungen im Serum, die sich unter den Bedingungen bei der ANIT-Cholestase der Ratte nachweisen lassen. Die Ikterogenin-Applikation führt zu keinen nachweisbaren Veränderungen im Serum (32,37).

Untersuchungs- bedingungen	n	Bilirubin mg%	GPT mU/ml	AP mU/ml	LAP mU/ml	Cholesterin mg%
Kontrolle	17	0,17 ± 0,1	19 ± 8,9	262 ± 106	17 ± 6	73 ± 13
ANIT 72 Std.	19	6,5 ± 3,1	186 ± 86	1022 ± 266	31 ± 6	301 ± 63
p	-	< 0,0005	< 0,0005	< 0,0005	< 0,0025	< 0,0005

Tab.7 Bilirubin, GPT,AP, LAP und Cholesterin im Rattenserum 72 Stunden nach einmaliger oraler Gabe von 100 mg/kg ANIT gegenüber einem Kontrollkollektiv.

3. Messung der Proteinsynthese in Darm, Milz, Haut und Aorta.

Eine gesteigerte Proteinsynthese nach ANIT-Gabe ist für die Leber spezifisch, denn andere untersuchte Organe (Tabelle 8) zeigen einen unveränderten (Milz, Haut) oder deutlich verminderten (Aorta, Darm) Einbau radioaktiver Aminosäuren.

Untersuchungs- bedingungen	n	Protein-Synthese dpm / mg Feuchtgewicht			
		Darm	Milz	Haut	Aorta
Kontrolle	3	54 $\pm$ 21	166 $\pm$ 68	85 $\pm$ 25	143 $\pm$ 36
ANIT 48Std.	3	21 $\pm$ 4.6	152 $\pm$ 27	56 $\pm$ 6.5	30 $\pm$ 7.0

Tab.8 Proteinsynthese in vitro in Darm, Milz,Haut und Aorta der Ratte 48 Stunden nach oraler Gabe von 100 mg/kg ANIT im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv.

4. Fibrinogen- und Albuminsynthese.

Der Nachweis einer deutlich erhöhten Proteinsynthese in der Leber bei menschlichen Lebererkrankungen und bei tierexperimentellen Leberschäden wirft die Frage auf, welche Proteine synthetisiert werden. In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob sich im Tierversuch Hinweise gewinnen lassen, daß die Serumeiweiße Fibrinogen und Albumin vermehrt synthetisiert werden.

Untersuchungs- bedingungen	n	Fibrinogen dpm / ml Serum	Albumin dpm / ml Serum
Kontrolle	4	309 $\pm$ 39	1700 $\pm$ 197
ANIT 72 Std.	10	301 $\pm$ 150	1603 $\pm$ 655

Tab.9 Fibrinogen- und Albuminsynthese in vivo 72 Stunden nach einmaliger oraler Verabreichung von 100 mg/kg ANIT gegenüber einer Kontrollgruppe. Die Markierung des Fibrinogens und Albumins erfolgte mit 2,5 μ C 14-C-Glycin und 2,5 μ C 14-C-L-Asparaginsäure. (siehe Tierversuche)

Wie aus Tabelle 9 zu ersehen ist, lassen sich nach PULS-LABELING weder beim Fibrinogen noch beim Albumin nennenswerte Unterschiede im Einbau von ^{14}C -Glycin und ^{14}C -L-Asparaginsäure nachweisen. Da beide Synthesen durch Cycloheximid fast vollständig hemmbar sind (Tabelle 10), ist eine unspezifische Adsorption der radioaktiven Substanzen unwahrscheinlich.

Untersuchungsbedingungen	n	Fibrinogen dpm / ml Serum	Albumin dpm / ml Serum
Kontrolle	11	3127 ± 1066	20621 ± 4366
+ Cycloheximid	5	32 ± 43	884 ± 259
p		0,0005	0,0005

Tab.10 Fibrinogen- und Albuminsynthese in vivo 72 Stunden nach dreimaligen intraperitonealen Injektionen von je 0,8 mg/kg Cycloheximid gegenüber einer Kontrollgruppe.

Die Markierung des Fibrinogens und Albumins erfolgte mit $5,0\text{ }\mu\text{C}$ ^{14}C -Leucin. (siehe Tierversuche)

5. Beeinflussung der ANIT-Cholestase durch Orotsäure und Nialamid.

Wie vorhergegangene Versuche gezeigt haben, führt die Verfütterung von 1% Orotsäurefutter zu einer erheblichen läppchenzentralen Leberzellverfettung, wobei der Neutralfettgehalt der Leber auf das ca. Zehnfache ansteigt (8). Gleichzeitig ist die Orotsäurefettleber durch einen hohen Glykogengehalt

Untersuchungsbedingungen	n	Bilirubin mg%	GPT mU/ml	AP mU/ml	LAP mU/ml	Cholesterin mg%
ANIT 72 Std.	19	$6,5 \pm 3,1$	186 ± 86	1022 ± 266	31 ± 6	301 ± 63
ANIT 72 Std. + Orotsäure	13	$7,4 \pm 2,7$	122 ± 33	910 ± 149	20 ± 9	255 ± 38
p	-	> 0,15	< 0,01	> 0,05	< 0,0005	< 0,01

Tab.11 Bilirubin, GPT, AP, LAP und Cholesterin im Rattenserum 72 Stunden nach einmaliger oraler Verabreichung von 100 mg/kg ANIT unter Orotsäureverfütterung im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv.

gekennzeichnet. Da sich die Leber bei der ANIT-Cholestase durch einen besonders niedrigen Glykogengehalt auszeichnet (11), wurde zunächst untersucht, ob sich die ANIT-Cholestase durch Vorbehandlung mit Orotsäure günstig beeinflussen läßt (Tab.11).

Durch die Orotsäurevorbehandlung konnte therapeutisch nicht viel erreicht werden; sie führte lediglich zu einer geringfügigen bis mäßigen Verringerung der GPT, LAP, und des Serumcholesterins, während die AP. und das Serumbilirubin unverändert blieben. Histologische Untersuchungen (14) haben gezeigt, daß bei zusätzlicher ANIT-Applikation der vorher erhöhte Glykogen- und Neutralfettgehalt 24 Stunden später nicht mehr nachweisbar ist, was sich auch durch chemische Untersuchungen des Glykogen- und Neutralfettgehaltes bestätigen ließ (11).

Außerdem wurde der Versuch gemacht, die ANIT-Cholestase durch zusätzliche Gabe des Monoaminoxidasehemmers Nialamid therapeutisch günstig zu beeinflussen. Nialamid wurde deshalb gewählt, weil es eine günstige Wirkung auf den Verlauf der mensch-

lichen Hepatitis und der sonst tödlich verlaufenden Hepatitis contagionis canis haben soll (4). Wie aus Tabelle 12 zu ersehen ist, läßt sich durch diese Therapie die ANIT-Cholestase der Ratte ebenfalls nicht günstig beeinflussen, da der Ikterus gleich bleibt und die cholestatischen Enzyme AP, LAP und Serumcholesterin wesentlich erhöht sind, gegenüber ANIT allein. Das wird verständlich, da im Gegensatz zur Nialamidwirkung auf die menschliche Leber, bereits nach Gabe von Nialamid bei der Ratte histologisch eine Leberzellschädigung nachweisbar ist.

Untersuchungsbedingungen	n	Bilirubin mg%	GPT mU/ml	AP mU/ml	LAP mU/ml	Cholesterin mg%
ANIT 72 Std.	19	$6,5 \pm 3,1$	186 ± 86	1022 ± 266	31 ± 6	301 ± 63
ANIT 72 Std. + Nialamid	10	$5,1 \pm 2$	124 ± 21	1266 ± 154	49 ± 14	546 ± 84
p	-	$> 0,1$	$< 0,025$	$< 0,05$	$< 0,0005$	$< 0,0005$

Tab.12 Bilirubin, GPT, AP, LAP und Cholesterin im Rattenserum 72 Stunden nach einmaliger oraler Applikation von 100 mg/kg ANIT unter gleichzeitiger Gabe von Nialamid im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv. (siehe Tierversuche)

6. Einfluß von Luminal auf die ANIT-Cholestase.

Der Befund erhöhter Syntheseleistungen bei menschlichen und tierexperimentellen Lebererkrankungen bietet insofern Interpretationsschwierigkeiten, als er sich kaum mit dem bisherigen Begriff der Leberinsuffizienz in Einklang bringen läßt. Diskutiert werden muß einerseits die Möglichkeit, daß nicht die Leberzellen sondern das aktivierte Mesenchym für die erhöhten Einbauraten verantwortlich sind, so daß die erhöhte ^{14}C -Aminosäureinkorporation Ausdruck einer mesenchymalen Reaktion darstellen würde. Weiterhin war zu untersuchen, wie weit der erhöhte Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren als Zeichen der Regeneration aufzufassen ist oder als pathologische anabole Reaktion - wie von POPPER (24) gefordert - zu deuten ist. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob dieser beobachteten erhöhten Proteinsynthese eine pathogenetische Bedeutung für die Entstehung des Ikterus zukommt. Zur Untersuchung dieser Frage wurde die ANIT-Cholestase der Ratte ausgewählt, da die orale Applikation von 100mg/kg ANIT - wie bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (3,5,7,13,15,18,19,20,22,23,28,32,34,37) - gut reproduzierbar zu einem cholestatischen Ikterus der Ratte führt (s.Tab.7).

Histologisch sind bei dieser Erkrankung eine nekrotisierende Cholangitis und fokale Parenchymnekrosen nachweisbar (Abb. 1,2).

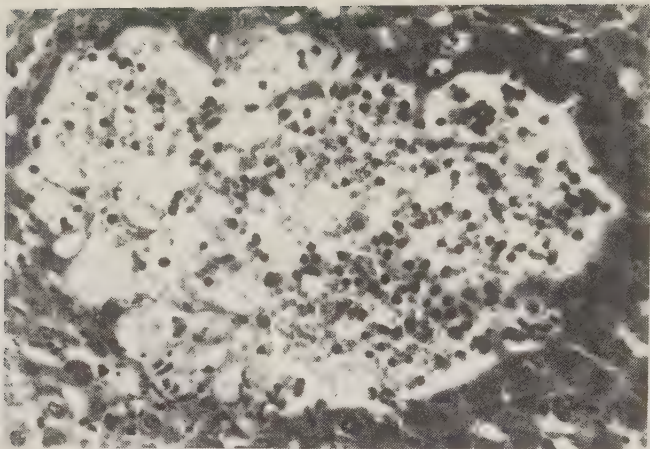


Abb.1 Fokale Parenchymnekrose in der Rattenleber
24 Stunden nach oraler Applikation von 100mg/kg ANIT.

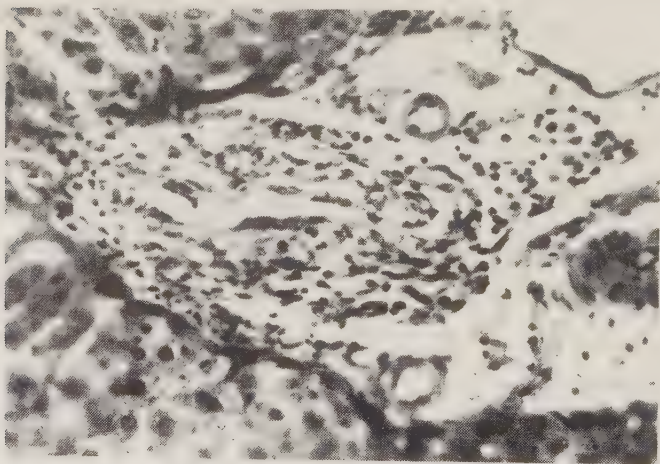


Abb.2 Entzündlich infiltrierte und verbreitertes
Periportalfeld in der Rattenleber 24 Stunden nach
100mg/kg ANIT. In den Gallengängen fanden sich aus-
gedehnte Epithelnekrosen.

Bei der ANIT-Cholestase wurde die Proteinsynthese in der Leber der zu untersuchenden Tiere durch fünftägige Vorbehandlung mit 50 mg/kg Luminal stärker gesteigert, als es durch alleinige ANIT-Gabe der Fall ist (Tab. 13). Wie Tabelle 13 zeigt, führt die Luminalvorbehandlung - wie in der Literatur hinreichend bekannt (2,25,26,27,30,33) - zu einer deutlichen Proteinsynthesesteigerung in der Rattenleber. Diese läßt sich ebenfalls nach ANIT-Gabe nachweisen.

Versuchsbedingungen	n	Protein-Synthese dpm/mg Feuchtgewicht	Proteingehalt in mg/100mg Feuchtgewicht	Lebergewicht in g/100g Körpergew.
Kontrolle	7	199 $\pm$ 121	15,2 $\pm$ 2,0	3,9 $\pm$ 0,26
ANIT	6	477 $\pm$ 237	19,3 $\pm$ 1,2	4,0 $\pm$ 0,4
Luminal	10	685 $\pm$ 379	21,0 $\pm$ 7,0	4,5 $\pm$ 0,3
ANIT + Luminal	9	782 $\pm$ 331	22,5 $\pm$ 5,8	4,7 $\pm$ 0,3

Tab. 13 Proteinsynthese in Rattenleberschnitten in vitro, Proteingehalt und Lebergewicht unter verschiedenen Versuchsbedingungen.

Die gemessenen Syntheseleistungen sind im Vergleich zu den Kontrollen statistisch signifikant. Weiterhin nimmt das Lebergewicht (g/100g Körpergewicht) sowie auch der Proteingehalt unter diesen Untersuchungsbedingungen deutlicher zu als unter ANIT allein (Tab. 13).

SIGNIFIKANZEN nach dem t-Test

	Proteinsynthese dpm/mg Feuchtgew.	Lebergew. in g/ 100g Körpergew.
Kontrolle:		
ANIT	$P < 0,0005$	$P > 0,25$
Kontrolle:		
Luminal	$P < 0,0025$	$P < 0,0005$
Kontrolle:		
ANIT+Luminal	$P < 0,0005$	$P < 0,0005$
ANIT:		
ANIT+Luminal	$P < 0,05$	$P < 0,0005$

Untersucht man unter diesen Bedingungen den klinischen Verlauf der ANIT-Cholestase, so läßt sich zeigen, daß sowohl 24 als auch 48 und 72 Stunden nach Gabe von ANIT unter zusätzlicher Luminalvorbehandlung ein eindeutig und signifikant stärker ausgeprägter cholestatischer Ikterus der Tiere nachweisbar ist (Tabelle 14 - 16).

Untersuchungsbedingungen	n	Bilirubin mg%	GPT mU/ml	AP mU/ml	LAP mU/ml	Cholesterin mg%
ANIT 24 Std.	9	$2 \pm 0,8$	67 ± 49	513 ± 181	12 ± 5	134 ± 21
ANIT 24 Std. + Luminal	18	$4,1 \pm 0,7$	184 ± 79	752 ± 207	22 ± 7	157 ± 27
p	-	< 0,0005	< 0,05	< 0,005	< 0,005	< 0,025

Tab.14 Bilirubin, GPT, AP, LAP und Cholesterin im Rattenserum 24 Stunden nach einmaliger oraler Applikation von 100 mg/kg ANIT und fünftägiger Vorbehandlung von 50 mg/kg Luminal.

Untersuchungs- bedingungen	n	Bilirubin mg%	GPT mU/ml	AP mU/ml	LAP mU/ml	Cholesterin mg%
ANJT 48 Std.	10	4,6 ± 0,8	139 ± 30	910 ± 307	20 ± 8	232 ± 52
ANJT 48 Std. + Luminal	10	9,2 ± 2,6	271 ± 66	1156 ± 188	42 ± 5	270 ± 56
p	-	< 0,0005	< 0,0025	< 0,05	< 0,0005	> 0,05

Tab.15 Bilirubin, GPT, AP, LAP und Cholesterin im Rattenserum 48 Stunden nach einmaliger oraler Applikation von 100 mg/kg ANIT und fünftägiger Vorbehandlung von 50 mg/kg Luminal.

Untersuchungs- bedingungen	n	Bilirubin mg%	GPT mU/ml	AP mU/ml	LAP mU/ml	Cholesterin mg%
ANJT 72 Std.	10	6,7 ± 1,8	119 ± 48	968 ± 178	36 ± 5	206 ± 43
ANJT 72 Std. + Luminal	10	11,1 ± 2	169 ± 50	1044 ± 464	57 ± 10	270 ± 38
p	-	< 0,0005	< 0,0005	> 0,3	< 0,0005	< 0,0025

Tab.16 Bilirubin, GPT, AP, LAP und Cholesterin im Rattenserum 72 Stunden nach einmaliger oraler Applikation von 100 mg/kg ANIT und fünftägiger Vorbehandlung von 50 mg/kg Luminal.

Der Serumbilirubinspiegel ist zu allen untersuchten Zeiten nahezu auf das Doppelte erhöht, ohne daß sich eine Hämolyse nachweisen läßt. Desgleichen lassen sich deutlich erhöhte Werte für die cholestatischen Enzyme AP. und LAP als auch für das Serumcholesterin nachweisen. Die GPT ist gleichfalls deutlicher erhöht als unter ANIT allein. Aufgrund des Verlaufes dieser Leberfunktionsproben im Rattenserum läßt sich eindeutig aussagen, daß die zusätzliche fünftägige Vorbehandlung der Tiere mit 50 mg/kg Luminal pro die zu einer wesentlich schwereren Lebererkrankung der Versuchstiere führt als ANIT allein.

7. Einfluß von Cycloheximid auf die ANIT-Cholestase.

Untersucht man daraufhin die Auswirkung einer Hemmung der Proteinsynthese in der Rattenleber durch gleichzeitige Verabfolgung von 0,8 mg/kg Cycloheximid (Actidion^R) pro die, so wird die Fibrinogen- und Albumin-Synthese in der Rattenleber fast vollständig unterdrückt (Tabelle 10). Wie Tabelle 17 zeigt, bleibt die Proteinsynthese in der Rattenleber unter Gabe von ANIT + Cycloheximid normal.

Versuchs- bedingungen	n	Protein-Synthese dpm/mg Feuchtgewicht	Proteingehalt in mg/100mg Feuchtgewicht	Lebergewicht in g/100g Körpergewicht
Kontrolle	7	199 ± 121	15,2 ± 2,0	3,9 ± 0,26
ANIT	6	477 ± 237	19,3 ± 1,2	4,0 ± 0,4
ANIT + Actidion	9	219 ± 104	18,0 ± 6,0	3,7 ± 0,23

Tab.17 Proteinsynthese in Rattenleberschnitten in vitro, Proteingehalt und Lebergewicht unter verschiedenen Versuchsbedingungen 48 Stunden nach ANIT-Applikation.

SIGNIFIKANZEN nach dem t-Test

Versuchs- bedingungen	Proteinsynthese dpm/mg Feuchtgew.	Lebergewicht in g/100 Körpergew.
Kontrolle: ANIT	$p < 0,0005$	$p > 0,25$
Kontrolle: ANIT+Actidion	$p > 0,35$	$p > 0,1$
ANIT: ANIT+Actidion	$p < 0,01$	$p < 0,05$

Cycloheximid = Actidion ^R

Untersucht man daraufhin den klinischen Verlauf der ANIT-Cholestase unter zusätzlicher Gabe von Cycloheximid, welches die Proteinsynthese in der Leber hemmt (9,10), so läßt sich zeigen, daß die sonst eindrucksvoll nachweisbare Cholestase fast vollständig unterdrückt wird (Tabelle 18). Der Serumbilirubinspiegel ist nur auf 2,2 mg% erhöht, während die GPT, AP und LAP ebenfalls beinahe normal bleiben und der Serumcholesterinspiegel deutlich geringer ansteigt.

Untersuchungs- bedingungen	n	Bilirubin mg%	GPT mU/ml	AP mU/ml	LAP mU/ml	Cholesterin mg%
ANJT 72 Std.	19	6,5 ± 3,1	186 ± 86	1022 ± 266	31 ± 6	301 ± 63
ANJT 72 Std. + Actidion	19	2,2 ± 1,4	38 ± 16	311 ± 95	19 ± 4	154 ± 46
p	-	< 0,0005	< 0,0005	< 0,0005	< 0,0005	< 0,0005

Tab.18 Bilirubin, GPT, AP, LAP und Cholesterin im Rattenserum 72 Stunden nach einmaliger oraler Gabe von 100 mg/kg ANIT und drei intraperitonealen Injektionen von je 0,8 mg/kg Cycloheximid im Vergleich zu einer Kontrollgruppe.

V. DISKUSSION

Der Diskussion soll eine kurze Zusammenfassung vorausgehen.

Es hat sich nachweisen lassen, daß der ^{14}C -Aminosäureinkorporation in das Leberprotein einer Neusynthese entspricht, denn die Syntheseleistungen der Leberschnitte sind hemmbar durch Blockade des Energiestoffwechsels (Stickstoffbegasung), durch Hemmung der Atmungskette durch KCN, des Glukoseabbaus durch Jodazetat und des Citratcyclus mit Fluorazetat. Gleichzeitig nimmt bei verstärktem Einbau das Lebergewicht zu, und der Proteingehalt der Leber ist vermehrt. Sowohl die RNS- als auch die DNS-Synthese sind bei der Ikterogenin- und ANIT-Cholestase gesteigert. Die gemessenen Veränderungen sind bezüglich der Proteinsynthese leberspezifisch, da sie sich in anderen Organen nicht nachweisen lassen. Die gesteigerte Proteinsynthese geht nicht mit einer erhöhten Synthese von Serumfibrinogen und Serumalbumin einher.

Durch gleichzeitige Orotsäure- oder Nialamid-Verabreichung läßt sich keine günstige Beeinflussung der ANIT-Cholestase erreichen.

Eine zusätzliche Proteinsynthesesteigerung nach Vorbehandlung mit Luminal führt zu einer erheblich

schwereren Cholestase; die Hemmung der Proteinsynthese in der Leber durch Cycloheximid dagegen kann die Cholestase fast vollständig unterdrücken.

In Bestätigung früherer Befunde (32,37) und in Bestätigung der Ergebnisse anderer Autoren (13) hat sich durch die Versuche in Tabelle 3 - 6 nachweisen lassen, daß nach intraperitonealer Ikterogenin- und oraler ANIT-Gabe in der Rattenleber gesteigerte Syntheseleistungen nachweisbar sind. In Ergänzung früherer Befunde läßt sich dabei belegen, daß sowohl die RNS- als auch die DNS-Synthese gesteigert ablaufen. Eine bestimmte zeitliche Korrelation besteht nur insofern als die Veränderungen durch Ikterogenin nach 48 Stunden deutlicher sind als nach 24 Stunden.

Ähnliches gilt auch für ANIT nach 72 Stunden gegenüber 48 Stunden.

Sichere Anhalte dafür, daß zunächst die DNS- und zeitlich nachfolgend die RNS-, Protein- und Cholesterin-Synthese aktiviert werden, lassen sich aus diesen Versuchen nicht gewinnen.

Während die gesteigerten Syntheseleistungen für Protein, RNS und DNS auch auf eine gesteigerte mesenchymale Reaktion zurückgeführt werden könnte, und damit nicht leberzellspezifisch zu sein brauchte, weist die gleichzeitig erhöhte Cholesterinsynthese daraufhin, daß die gemessenen Veränderungen

eine Reaktion der Leberepithelzellen darstellen. Dies wird durch die in Tabelle 7 dargestellten Untersuchungen gestützt, in der gezeigt wird, daß diese Veränderungen in anderen Organen nicht nachweisbar sind, so daß eine unspezifische mesenchymale Reaktion wenig wahrscheinlich ist.

Unter den Bedingungen der ANIT-Cholestase hat sich trotz einer erhöhten Proteinsynthese in der Leber keine Veränderung des 14-C-Glycin- und des 14-C-L-Asparaginsäureeinbaus in Fibrinogen und Albumin nachweisen lassen. Das steht im Gegensatz zu den Befunden von MAJUMDAR (17), der bei einer gesteigerten Proteinsynthese in vitro auch eine deutlich erhöhte Fibrinogen- und Albumin-Synthese in vivo nachweisen konnte. Allerdings wurde die Steigerung nicht durch eine Cholestase sondern durch partielle Hepatektomie und Stress bewirkt.

Die negativ verlaufenen Therapieversuche durch Orotsäureverfütterung dürften eine befriedigende Erklärung darin finden, daß durch zusätzliche ANIT-Applikation 24 Stunden später weder histologisch noch chemisch ein erhöhter Glykogen- und Fettgehalt in der Rattenleber nachweisbar ist(11,14).

Für die Nialamidbehandlung (4) muß im Gegensatz zur günstigen Wirkung auf die menschliche Hepati-

tis eine zusätzliche Schädigung der Rattenleber angenommen werden, da einerseits die cholestase-anzeigenden Enzyme AP, LAP und das Cholesterin stärker erhöht sind, und andererseits die alleinige Nialamidgabe zu histologisch deutlich nachweisbarer Schädigung in der Rattenleber führt.

Ein wesentlicher Anstoß zu den Tierexperimenten in der vorliegenden Arbeit war der Nachweis einer gesteigerten Proteinsynthese in Punktatzylindern von leberkranken Patienten (29). Zur Frage, wie man den Befund einzuordnen hat, reichen Untersuchungen an Leberkranken nicht aus, da sich die in der Klinik beobachtbaren Lebererkrankungen und die biochemischen Gegebenheiten nicht systematisch variieren lassen.

Die in Tabelle 12 - 15 durchgeführten Versuche sollten die Frage klären, ob einer erhöhten Proteinsynthese eine pathogenetische Bedeutung bei der Cholestase zukommt. Dabei ließ sich zeigen, daß zusätzliche Vorbehandlung mit Luminal zu einer wesentlich schwereren cholestatischen Erkrankung führte, wohingegen sich durch Hemmung der Proteinsynthese in der Leber mit Cycloheximid die nach ANIT auftretende Cholestase fast völlig unterdrücken läßt. Diese Befunde lassen sich am besten deuten, wenn man

davon ausgeht, daß, wie von POPPER gefordert (24), durch die ANIT-Applikation eine pathologische anabole Reaktion der Leberzellen ausgelöst wird, wobei die Höhe der gemessenen Proteinsynthese offensichtlich das Ausmaß der pathologischen anabolen Reaktion wiedergibt.

Durch die zusätzliche Luminalbehandlung wird die pathologische anabole Reaktion sicher erheblich verstärkt, während sie durch die gleichzeitige Cycloheximidbehandlung fast völlig unterdrückt wird (Tabelle 17). POPPER hat bereits die Veränderungen, die allein durch Luminal ausgelöst werden, als pathologische anabole Reaktion aufgefaßt (6,12,24,27,30,33).

Die vorgelegten klinisch-chemischen Befunde bezüglich des Verlaufes der ANIT-Cholestase sprechen dafür, daß nicht nur durch die Leberschädigung nach ANIT-Cholestase eine pathologische anabole Reaktion in der Leberzelle ausgelöst wird, sie zeigen außerdem deutlich, daß das Ausmaß dieser pathologischen anabolen Reaktion die Schwere der Erkrankung beeinflußt. Ein erhöhter Einbau von 14-C-Aminosäuren aufgrund einer erhöhten Regeneration kann diese Befunde nicht erklären. Die histologischen Veränderungen nach zusätzlicher Luminalbehandlung sind bezüglich der Nekrosen im Leberläppchen schwerer.

Ein morphologischer Anhalt für eine verstärkte
Regeneration läßt sich dagegen nicht erkennen. Im
Gegensatz dazu sind die morphologischen Verän-
derungen nach Cycloheximid besonders aber die
Nekrosen geringer als unter ANIT allein.

Zusammenfassend werden die erhobenen Befunde in
dem Sinne gedeutet, daß während der ikterischen
Phase der ANIT-Cholestase der Ratte eine patholo-
gische anabole Reaktion der Leberzellen beobachtet
werden kann, deren Ausmaß die Aktivität der vorlie-
genden Lebererkrankung, gemessen an den klinisch-
chemischen Veränderungen im Serum, mitbedingt.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluß einer gesteigerten Proteinsynthese bei der ANIT-Cholestase der Ratte auf die Entwicklung des Ikterus untersucht werden. Es ließ sich eindeutig zeigen, daß die Leber unter Einfluß toxischer Substanzen (ANIT, Ikterogenin, Luminal) mit einer Synthesesteigerung nicht nur für Protein, sondern auch für RNS, DNS, NAD und Cholesterin reagiert. Die pathologische anabole Reaktion (POPPER) nach ANIT läßt sich eindrucksvoll durch zusätzliche Luminalbehandlung steigern und durch Cycloheximid fast vollständig unterdrücken. Das Ausmaß der pathologischen anabolen Reaktion wurde gemessen an der ¹⁴C-Aminosäureinkorporation. Es ließ sich nachweisen, daß die Höhe der Proteinsynthese gut mit der Intensität des cholestatischen Ikterus korreliert.

Die vorgelegten Ergebnisse werden diskutiert.

VII. LITERATUR

1. ARIAS, J.M.

Effets of a plant acid (icterogenin) and certain anabolic steroids on the hepatic metabolism of bilirubin and sulfbromphtalein.

Ann.N.Y.Acad.Sci. 104, 1014, (1963)

2. BADER, G.

Elektronenmikroskopische Veränderungen der normalen und regenerierenden Leberzelle der Ratte durch Lepinal.

Acta Hepato-splenol. 15, 400, (1968)

3. CAMERON, G.R. and MUZAFFAR HASAN, S.

Disturbances of structure and function in the liver as the result of biliary obstruction.

J.Path.and Bact. 75, 333, (1958)

4. CIFUENTES, B.H.; ALBORNOZ-PLATA, A.; NUNEZ, E.;

TRIANA, S.; BINTRAGO, B.

Nat.Invest.of Health.

Abstract.Gastroenterology 52, 1078, (1967)

5. CLODI, P.H.; STEFENELLI, N.

Gallenfluß, Gallendruck und Bromsulphtaleinausscheidung bei der experimentellen Cholestase der Ratte.

Zeitschr.für die ges.exp.Medizin 142, 1, (1967)

6. COSSEL, L.

Die menschliche Leber im Elektronenmikroskop.

VEB.Gustav-Fischer-Verlag (1964)

7. ELIAKIM, M.; EISNER, M. and UNGAR, H.

Experimental intra-hepatic obstructive jaundice following ingestion of alpha-naphthyl-iso-thiocyanate.

Bull.Res.Counc.Israel 8, 7, (1959)

8. FRICK, H.

Proteinsynthese und experimentelle Fettleber der Ratte.
Inaugural Dissertation, Gießen 1969, in Vorbereitung.

9. GROLLMAN, A. P.

Inhibitors of protein biosynthesis. V. effects of Emetine on protein and nucleic acid. Biosynthesis in HeLa-cells.

J. of Biol. Chem. 243, 4089, (1968)

10. HILL, R. B.; GAETANI, S.; PAOLUCCI, A-M; RAMARAO, P. B.

Vitamin K and Biosynthesis of Protein and Prothrombin.

J. of Biol. Chem. 243, 3930, (1968)

11. HOMANN, J.

Glykogengehalt und Glykogensynthese der Leber bei der experimentellen intrahepatischen Cholestase der Ratte.
Inaugural Dissertation, Gießen 1969, in Vorbereitung.

12. HÜBNER, G.

Die pathischen Reaktionen der Leber.

Gustav-Fischer-Verlag Stuttgart. 1968

13. KATTERMANN, R.; CREUTZFELD, W.

Lipid synthesis in rat liver in experimental cholestasis

V. International Meeting of the International Association for the Study of the Liver. Karlsbad 1968

14. LEINWEBER, B.; RICHTER, F.; KÜHN, H. A.

Histologische Befunde und Proteinsynthese der Rattenleber bei ANIT-Cholestase.

75. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Med.
Wiesbaden, 14.-17. April 1969

15. LOPEZ, M. and MAZZANTI, L.

Experimental investigations on alpha-naphthyl-iso-thiocyanate as a hyperplastic agent of the biliary ducts in the rat.

J. Path. and Bact. 69, 243, (1955)

16. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. and RANDALL, R.J.; Protein measurement with the folin reagent. *J. of Biol. Chem.* 193, 265, (1951).

17. MAJUMDAR, C.; TSUKADA, K. and LIEBERMAN, I.
Liver Protein Synthesis after Partial Hepatectomy and Acute Stress.
J. of Biol. Chem. 242, 700, (1967)

18. MAZZANTI, L. and LOPEZ, M.
Interna di epatopatie sperimentali sui rapporti tra lesione epitaliale e proliferazione mesenchymale nelle fibrosi da alfa-naftil-isotiocianato.
Arch. Vecch. Anat. Pat. 17, 825, (1952)

19. Mc. LEAN, M.R. and REES, K.R.
Hyperplasia of bile-ducts induced by alpha-naphthylisothiocyanate: experimental biliary cirrhosis free from biliary obstruction.
J. Path. and Bact. 76, 175, (1958)

20. MORAN, E.; ELIAKIM, A.; SUCHOWOLSKI and UNGAR, H.
Serum Vitamin B₁₂ and Glutamic-oxalacetic transaminase in experimental intrahepatic obstructive jaundice.
Gastroenterology 40, 408, (1968)

21. NEUBERT, D.
Beeinflussung des Nukleinsäure- und Proteinstoffwechsels durch Pharmaka.
Der Internist 7. Jahrgang, Heft 8 (1966)

22. POPPER, H.; KENT, G. and STEIN, R.
Ductular Cell Reaction in the Liver in Hepatic Injury.
J. Mount. Smai. Hosp. N.Y. 24, 551, (1957)

23. POPPER, H. and SCHAFFNER, F.
Pathology Jaundice Resulting from Intrahepatic Cholestasis.
J. A. M. A. 169, 1447, (1959)

24. POPPER,H.

Panel discussion on drug injury.

V.International Meeting of the International Association
for the Study of the Liver. Prag 1968

25. REMMER,H.

Die Induktion arzneimittelabbauender Enzyme im endo-
plasmatischen Retikulum der Leberzelle durch Pharmaka.
Dtsch.Med.Wschr. 92, 2001, (1967)

26. REMMER,H.; MERKER,H.J.

Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem
Retikulum in der Leberzelle während der Behandlung
mit Phenobarbital.

Klin.Wschr. 41,276, (1963)

27. REMMER,H.

Einfluß von Pharmaka auf Proteinsynthesen in der
Leber. Vortrag im Pharmakol. Institut der Justus Liebig
Universität am 9.5.1969

28. RICHTER,E.; GRÜN,M.; KÜHN,H.A.

Proteinsynthese und Ikterus bei der ANIT-Cholestase
der Ratte. 75. Tagung der Deutschen Gesellschaft
für Innere Medizin Wiesbaden, 14.-17.4.1969

29. RICHTER,E.; CLAUDITZ,S.; LEINWEBER,B.; KÜHN,H.A.

Erhöhte Proteinsynthese in Leberpunktaten von Patienten
mit akuter Hepatitis.

Acta Hepato-Splenol. 15, 376,(1968)

30. SCHLICHT,J.; KORANSKY,W.; MAGOUR,S.; SCHULTE-HERMAN

Größe und DNS-Synthese der Leber unter dem Einfluß
körperfremder Stoffe.

Naunyn.-Schmiedebergs Arch.Pharmak. und exp.Path.
261, 26, (1968)

31. SCHMIDT, G.; THANNHAUSER, S.J.

A method for the determination of desoxyribonucleic, ribonucleic acid, and phosphoprotein in animal tissues. J.Biochem. 161, 83, (1945)

32. SCHNEIDER, M.

Untersuchungen zur Proteinsynthese bei der experimentellen intrahepatischen Cholestase der Ratte. Inaugural Dissertation, Giessen 1969, in Vorbereitung.

33. SCHULTE-HERMANN, R.; THOM, R.; SCHLICHT, J.; KORANSKY, W.

Zahl und Hoidiegrad der Zellkerne der Leber unter Einfluß körperfremder Stoffe.

Naunyn.-Schmiedebergs Arch.Pharmak.u.exp.Path. 261, 42, (1968)

34. STEFENELLI, N.; HOLZER, J.H.

Experimentelle Cholestase der Ratte durch einmalige Gabe von Alpha-Naphthyl-Iso-Thiocyanylt.

Histologisch und histochemisch erfaßbare Veränderungen der Leber.

Zeitschr. für die gesamte exp.Medizin 139, 762, (1965)

35. UNGAR, H.; MORAN, E.; EISNER, M. and ELIAKIM, A.

Rat intrahepatic biliary tract lesion from alpha-naphthyl-iso-thiocyanate.

Arch.Path. 73, 427, (1962)

36. WEISBURGER, J.H.; SHIRASU, Y.; GRANTHAM, P.H.; WEISBURGER, E.

Chloramphenicol, Proteinsynthesis, and Metabolism of the Carcinogen N-2-Fluorenyldiacetamide in Rats.

J.of Biol.Chem. 242, 372, (1967)

37. WINTER, E.

Untersuchungen zur Proteinsynthese der Leber bei der ANIT-Cholestase der Ratte.

Inaugural Dissertation, Giessen 1969, in Vorbereitung.

38. WITH, T.K.

Bile Pigments: Chemical, Biological, and Clinical Aspects.

Academic Press New York and London. S. 218 - 226 (1968)

LEBENS LAUF

Als fünftes von sieben Kindern des Arztes Dr. med. Richard Grün wurde ich, Martin Grün, am 1. Mai 1942 in Freiburg im Breisgau geboren. Nach der Grundschule besuchte ich von 1954 bis 1960 das Städt. Gymnasium in Witten. Nach einem Wechsel auf das Gymnasium Canisianum in Lüdinghausen legte ich dort im Februar 1965 die Reifeprüfung ab. Zum Sommersemester 1965 immatrikulierte ich mich an der Philipps-Universität in Marburg zum Medizinstudium. 1967 legte ich dort die ärztliche Vorprüfung ab. Vom Wintersemester 1967/68 an studierte ich die klinischen Fächer an der Justus Liebig-Universität in Giessen, wo ich am 13. Januar 1971 das Staatsexamen ablegte.

Herrn Prof. Dr. H. A. Kühn danke ich sehr herzlich
für die günstigen Arbeitsbedingungen in seinem
Labor.

Herrn Dr. E. Richter bin ich für die Überlassung
des Themas und für die Hilfe bei der Bearbeitung
zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. B. Leinweber danke ich für die Beurtei-
lung der histologischen Befunde.

